

中药正性影响骨髓间充质干细胞成骨分化及机制的进展*

张 昕^{1,2}, 李玛琳^{2,1△}

(1. 昆明医科大学药学院暨省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500; 2. 云南中医学院药学院, 云南昆明 650500)

摘要: 骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)具有多能分化能力,并具有易于获得、低免疫排斥性等特点,现今已成为研究热点之一,其已在中药研究中有广泛应用,尤其是在促其成骨相关研究中,中药可有效促进 BMSCs 成骨,提高碱性磷酸酶、骨钙素等成骨标志因子的表达,同时研究者对中药促成骨机制也有深入研究。本文就中药正性影响 BMSCs 成骨分化的研究进行总结。

关键词: 中药; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 正性影响; 机制; 进展

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)03-0091-04

骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)由Friedenstein等^[1]发现以来,即认为其为骨形成等的种子细胞。研究表明,BMSCs可向成骨细胞分化,成骨细胞进而向骨细胞分化,并在此基础上构建骨骼^[2]。BMSCs的向成骨分化的能力,和中药治疗骨折、骨质疏松等骨疾病有理论上的相通性。目前补肾药、补气药、补血药等多用于骨折等治疗^[3],取得了较好的疗效^[4-5],但前期的研究多集中临床观察研究、或骨组织本身,此类中药如何达到治疗效果的,基于BMSCs的成骨相关研究为此提供了初步的答案。现就中药正性影响BMSCs向成骨细胞的分化的研究进行总结,以期以后的研究提供参考。

1 中药复方对BMSCs成骨分化的影响

中药复方成份复杂,进入细胞培养体系时必须考虑其整体效应。田代真一提出含药血清实验方法的设想,并进行了一系列研究工作^[6]。含药血清或血清药理学方法已广泛应用于中药药理学研究中。研究者使用云南白药含药血清^[7]、左归丸含药血清^[8]、骨康含药血清^[9]等培养大鼠BMSCs,成骨分化效应较为明显,碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(Bone gamma-carboxyglutamic-acid-containing proteins, BGP)等成骨标志型因子表达量明显上

升。在研究不同浓度含药血清的对BMSCs成骨分化影响过程中,李盛华等^[10]给与BMSCs不同浓度的陇中损伤散含药血清,发现10%浓度含药血清促成骨作用最强,其他浓度促成骨效力较差。

复方方剂或其提取物作为整体直接加入细胞培养体系中也较为常见,周亚娜等^[11]分别制备补肾化痰药、补肾药、化痰药复方的提取物,诱导大鼠BMSCs成骨分化,三类药物均有促成骨分化能力,但补肾化痰药诱导成骨分化能力强于补肾药和化痰药。谭峰^[3]使用水煎浓缩法提取六味地黄丸、肾气丸、左归丸、右归丸的主要有效成分,分别加入BMSCs的培养基中,发现左、右归丸的成骨效力较强。

2 单味中药对BMSCs成骨分化的影响

中药复方按照君臣佐使原则配伍,但是单味中药及其提取物有没有和中药复方相同或相近的功效?对此问题,研究者进行了大量的研究工作。淫羊藿系补肾药,其与代谢产物均为研究热点。研究者使用淫羊藿含药血清^[12]培养BMSCs,含药血清组有明显的促成骨作用,同时,有效抑制BMSCs向破骨细胞方向分化。研究者同样对淫羊藿提取的单体和代谢产物进行了研究,发现淫羊藿苷^[13]、淫羊藿次苷II^[14]、淫羊藿素和脱水淫羊藿素^[15]中除脱水淫羊藿素以外均具有很强的成骨效力,吴涛等^[16]对淫羊藿

* 基金项目: 国家自然科学基金(NO:30860357);国家科技重大新药创制专项资助项目(NO:2008ZX0902)

收稿日期: 2013-05-14 修回日期: 2013-05-22

作者简介: 张昕(1985~),男,安徽芜湖人,硕士研究生,从事天然产物活性和机理方向研究。

△通信作者: 李玛琳, E-mail: limalinb@vip.163.com.

昔促 BMSCs 成骨分化是否有剂量依赖性进行研究,发现在淫羊藿苷常规剂量内,其促成骨有明显的剂量依赖性。研究者同样发现肉苁蓉含药血清^[17]、小檗碱单体^[18]、羌活鱼含药血清及其代谢提取物^[19-20]等有明显的促 BMSCs 成骨作用,ALP 等成骨标志物高表达。但研究者^[21]发现泽漆的提取物大戟苷能抑制大鼠 BMSCs 的成骨分化,具有剂量依赖性,随着培养时间的延长,骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)等成骨分化标志物的表达呈下降趋势。

3 中药对 BMSCs 成骨分化影响的机制研究

中药对 BMSCs 成骨分化机制集中在促分裂素原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPK)通路等的激活,引起成骨相关转录因子 Runx2/Cbfa1 表达的上调^[22]。仲卫红^[23]利用同位素标记相对和绝对定量技术(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)对土鳖虫含药血清拮抗由激素引起的成脂分化过程中的蛋白表达进行了透彻的分析,与成骨有关的 TGF- β 上调明显。杨丽等^[13]发现淫羊藿苷能促进 BMSCs 高表达转化生长因子 β -1 (Transforming growth factor- β -1, TGF β -1)和骨形成蛋白-2(Bone morphogenetic pro-

tein, BMP-2)。韩桂秋等^[24]在研究金雀花提取物金雀异黄酮对缺氧体外培养大鼠 BMSCs 成时,发现金雀异黄酮能提高 Runx2 和 BMP-2 的表达水平,且呈现出剂量依赖性特点。龚建文等^[25]通过实验证明中药骨康方诱导去势大鼠 BMSCs 成骨分化主要是通过激活了 P38-MAPK 信号传导通路,并通过介导 Cbfa1 活性和表达这一关键点从而发挥调控作用。对于 Smads 通路,当前的研究较少,基于现有证据很多骨伤科常用中药可以引起 BMP 类蛋白的表达,基于成骨通道目前的研究现状,Smads 通路理应有所表达。Cai M 等^[26]研究淫羊藿提取成份茂藿苷 A (Maohuoside A)促小鼠 BMSCs 成骨分化过程中,发现 Smad4 有高表达,提示 Smads 通路有参与成骨分化的可能。

4 小结

如前文所述及,中药及其提取物可以正向影响 BMSCs 的成骨分化,上调 ALP、骨钙素、BMP 蛋白、Runx2 等成骨标志物或相关蛋白的上调,通过相应的膜上受体和胞内通道引导 BMSCs 进入成骨分化。将与正性促 BMSCs 成骨分化有关标志物和蛋白及其通路有关的中药总结如表 1、表 2。

表 1 成骨分化主要标志物和蛋白的作用及起正性作用的中药及其提取物

蛋白	作用	单味中药及提取物	复方中药及提取物
ALP	成骨分化早期标志	杜仲含药血清 ^[27] 、茶黄素 ^[28] 、土鳖虫 ^[29] 等	云南白药含药血清 ^[7] 、生肌液 ^[30] 和陇中损伤散 ^[10] 等
骨钙素	成骨分化功能标志物,骨矿化必须	土鳖虫 ^[29] 、小檗碱 ^[18] 、淫羊藿及其提取物 ^[31-32] 、川续断皂苷 VI ^[33] 和木通皂苷 D ^[34] 等	生肌液 ^[30] 、骨康方 ^[25] 、六味地黄丸 ^[35] 等
BMP 蛋白	最强的促成骨细胞因子	金雀异黄酮 ^[24] 、丹参酮 II A ^[36] 、三七总皂苷 ^[37] 等	骨康含药血清 ^[9] 、生肌液 ^[30] 、牡蛎钙补肾中药含药血清 ^[38] 等
Runx2	成骨转录特异性结合因子,成骨标志性因子	淫羊藿苷 ^[31, 39] 、丹参酮 II A ^[36] 、川续断皂苷 VI ^[33] 等	云南白药含药血清 ^[7] 、骨康方含药血清 ^[25] 、六味地黄丸和健骨二仙丸含药血清 ^[35] 等

表 2 对成骨分化受体、信号蛋白及通道起正性作用中药及其提取物

受体及信号通路	单味中药及其提取物	复方中药及其提取物
BMP 受体	淫羊藿 ^[40] 、补骨脂素 ^[40] 、齐墩果酸 ^[40] 等	
维生素 D 受体	龟板提取物 ^[41]	金匱肾气丸含药血清 ^[42] 等
雌激素受体	骨碎补提取物 ^[43] 、淫羊藿次苷 II ^[32] 等	解氏金水丸含药血清 ^[44] 等
P38-MAPK 蛋白及通路	淫羊藿苷 ^[45] 、木通皂苷 D ^[34] 等	骨康含药血清 ^[25] 等
Smads 蛋白及通路	牡蛎 ^[46] 等	骨疏康 ^[46] 等
Wnt 蛋白及通路	淫羊藿黄酮 ^[47] 等	补肾调肝方 ^[48] 等

5 问题与展望

我国中医中药对于骨伤的治疗有很多记载,结合现代组织工程和细胞生物学,应对这些中医中药促骨伤修复的研究逐渐深入,就其当前研究现状,尚有如下问题:(1)中药血清药理方法是现在的一个研究热点,研究者使用该方法取得中药体内代谢产物,再加入到细胞培养体系中,但是该方法缺乏质量控制体系等。中药复方或单方处理后加入到培养体系中,此法需考虑受试物含有的无关成份对实验结果的干扰,这些无关成份有可能导致培养体系的pH值等指标失衡,最终可干扰实验结果。(2)有一些研究者已经在探讨机制问题,但是研究上没有完全深入,机制问题仅停留在激活的胞内通道的种类或者成骨相关基因的表达,尚无结合胞内胞外信号通路整体研究的报道,无全面结合剂量、时相、其临床效应等加以解释的报道,同时转化医学没有在此类研究中体现。研究多集中于正性促进 BMSCs 成骨分化的方向,或抑制其向成脂方向分化,但是成脂方向是否是成骨方向的对立面,研究界还没有定论;骨骼的形成和修复需要成骨和破骨相互协作完成,那么破骨行为是否可以理解成为成骨行为的反面,中药如何在细胞层面调节成破骨行为的,进而调节骨形成骨修复等骨生物学行为的,目前此类报道较为少见。

未来研究应更深入在机制和中药单体的研究,不应停留在是否有成骨效力或无成骨效力层面做简单探讨,应深入在细胞分子生物学水平上阐明中医药影响 BMSCs 成骨分化的机制,同时通过转化医学概念双向结合临床和基础研究资料,为中医药临床治疗骨伤提供理论依据,为筛选出活性单体提供实验基础和实验依据,使中医药在临床骨科等的研究前沿占有一席之地。

参考文献

- [1] Friedenstein A J, Petrakova K V, Kurolesova A I, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues [J]. Transplantation, 1968, 6(2): 230-247.
- [2] Kanczler J M, Oreffo R O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone[J]. European cells & materials, 2008, 15: 100-114.
- [3] 谭峰. 补肾方剂诱导骨髓间充质干细胞增殖分化的理论和实验研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2011.
- [4] 向科明, 赖洪华, 陈国远, 等. 补肾活血法治疗骨折的临床疗效观察[J]. 河北医学, 2011, 17(3): 395-397.
- [5] 成重玉. 补肾活血汤治疗骨质疏松性椎体压缩骨折 PKP 术后的临床疗效观察[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2012.
- [6] Iwama H, Amagaya S, Ogihara Y. Effect of shosaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method [J]. Journal of ethnopharmacology, 1987, 21(1): 45-53.
- [7] 张慧. 云南白药含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞增殖和向成骨分化的影响[D]. 昆明:昆明医学院, 2006.
- [8] 徐凌霄, 高俊, 张前德. 左归丸含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞骨向分化中碱性磷酸酶含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 149-152.
- [9] 徐无忌. 骨康对不同诱导条件下 MSCs 分化影响及 BMP-2 对成骨分化的作用[D]. 广州:广州中医药大学, 2008.
- [10] 李盛华, 叶丙霖. 陇中损伤散含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2010, 18(3): 4-7.
- [11] 周亚娜. 补肾化痰法影响骨髓间充质干细胞成脂和成骨分化的实验研究[D]. 武汉:湖北中医学院, 2008.
- [12] 杨月琴. 淫羊藿对骨细胞分化的作用及 CD44、FN 的表达影响[D]. 武汉:武汉体育学院, 2008.
- [13] 杨丽, 张荣华, 朱晓峰, 等. 淫羊藿苷对大鼠间充质干细胞骨向分化过程中转化生长因子 β -1、骨形态发生蛋白 2 表达的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(19): 3518-3522.
- [14] 翟远坤, 陈克明, 葛宝丰, 等. 淫羊藿次苷 II 促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨性分化过程中 iNOS 活性和 NO 生成量的变化[J]. 药学报, 2011, 46(04): 383-389.
- [15] 翟远坤, 李志忠, 陈克明, 等. 淫羊藿素和脱水淫羊藿素对骨髓间充质干细胞成骨性分化影响的比较研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(11): 837-842.
- [16] 吴涛, 徐俊昌, 南开辉, 等. 淫羊藿苷促进羊骨髓间充质干细胞的增殖和成骨分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(19): 3725-3729.
- [17] 曾建春, 樊粤光, 刘建仁, 等. 肉苁蓉含药血清诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究 [J]. 中国骨伤, 2010, 23(8): 606-608.
- [18] 杨玮, 徐道华, 周晨慧, 等. 小檗碱对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1560-1563.
- [19] 谢兴文, 许伟, 李宁. 羌活鱼含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(32): 6016-6020.

- [20] 谢兴文,许伟,李宁. 羌活鱼研粉物、水提及酸提物含药血清对骨髓间充质干细胞增殖及向成骨分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(36):6767-6771.
- [21] 杨蕾,王娟飞,李晓帆,等. 大戟苷抑制大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化[J]. 现代生物医学进展,2012,12(22):4201-4204.
- [22] Chen G,Deng C,Li Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation [J]. International journal of biological sciences,2012,8(2):272-288.
- [23] 仲卫红. 土鳖虫含药血清对激素诱导骨髓间充质干细胞成脂和成骨分化差异蛋白组学的影响[D]. 福州:福建中医药大学,2011.
- [24] 韩桂秋,葛宝丰,陈克明,等. 金雀异黄酮对体外培养缺氧大鼠骨髓间充质干细胞增殖与成骨分化的影响[J]. 中国药理学杂志,2011,46(16):1248-1253.
- [25] 龚建文. 从 P38 信号通路探讨中药骨康方对去势大鼠 MSCs 成骨分化的机制研究[D]. 广州:广州中医药大学,2011.
- [26] Cai M,Li G,Tao K,et al. Maohuoside A Acts in a BMP-dependent Manner during Osteogenesis [J]. Phytotherapy research:PTR,2012.
- [27] 曾建春,樊粤光,刘建仁,等. 杜仲含药血清诱导骨髓间充质干细胞定向分化的实验研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(09):2136-2138.
- [28] 路玉峰. 茶黄素含药血清对兔骨髓基质干细胞成骨分化影响[D]. 合肥:安徽医科大学,2009.
- [29] 李树强,于涛,齐振熙. 土鳖虫对激素诱导骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国骨伤,2010,23(12):921-924.
- [30] 张文海,李秀兰,张杨,等. 中药生肌液对体外培养兔骨髓间充质干细胞成骨活性的影响(英文)[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(37):7489-7493.
- [31] 翟远坤,葛宝丰,陈克明,等. 淫羊藿苷与其代谢产物淫羊藿次苷 II 对骨髓间充质干细胞成骨性分化影响的比较研究[J]. 中药材,2010,33(12):1896-1900.
- [32] 翟远坤,陈克明,葛宝丰,等. 淫羊藿次苷 II 通过激活雌激素信号通路促进骨髓间充质干细胞的成骨性分化[J]. 中国药理学通报,2011,27(10):1451-1457.
- [33] 武密山,赵素芝,任立中,等. 川续断皂苷 VI 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究[J]. 中国药理学通报,2012,28(2):222-226.
- [34] 张云辉,刘成成,祝爱珍,等. 木通皂苷 D 通过丝裂原活化蛋白激酶信号通路促进大鼠骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞[J]. 中国病理生理杂志,2012,28(8):1455-1460.
- [35] 程志安,韩凌,危建安,等. 六味地黄丸、金匮肾气丸及健骨二仙丸含药血清对 BMSCs 成脂、成骨细胞分化相关基因的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(2):261-265.
- [36] 郭威. 丹参酮 II A 对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化影响的实验研究[D]. 锦州:辽宁医学院,2012.
- [37] 刘东宁,王云国,刘志礼,等. 三七总皂甙对大鼠骨髓基质细胞骨形成蛋白-2 表达及碱性磷酸酶活性的影响[J]. 南昌大学学报(医学版),2012,52(9):9-13.
- [38] 胡静,郑洪新. 牡蛎钙补肾中药血清对骨形成蛋白-4 诱导成骨信号转导机制的调控作用[J]. 中国中医骨伤科杂志,2009,17(7):1-4.
- [39] Ma H P,Ming L G,Ge B F,et al. Icariin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization in vitro[J]. Journal of cellular biochemistry,2011,112(3):916-923.
- [40] 卞琴,黄建华,杨铸,等. 三种补肾中药有效成分对皮质酮致骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞基因表达谱的作用[J]. 中西医结合学报,2011,9(2):179-185.
- [41] 侯秋科,吴静,易香华,等. 龟板提取物上调维生素 D 受体表达促骨髓间充质干细胞向成骨分化[J]. 中草药,2010,41(4):607-612.
- [42] 魏义勇,石印玉,詹红生. 补肾中药对成骨细胞维生素 D 受体与核心结合因子 $\alpha 1$ 蛋白表达的影响[J]. 上海中医药杂志,2005,39(11):47-50.
- [43] Wang X,Zhen L,Zhang G,et al. Osteogenic effects of flavonoid aglycones from an osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* --an in vitro efficacy study [J]. Phytomedicine:international journal of phytotherapy and phytopharmacology,2011,18(10):868-872.
- [44] 郑希福. 解氏金丹水丸对高脂状态下大鼠成骨细胞 BMP2、ER 表达的影响[D]. 大连:大连医科大学,2008.
- [45] 毛项颖,卞琴,沈自尹. 淫羊藿苷介导 MAPK 信号通路促进间充质干细胞株 C3H10T1/2 成骨分化的体外研究[J]. 中西医结合学报,2012,10(11):1272-1278.
- [46] 胡静. 肾虚骨质疏松症大鼠的骨形成蛋白-4 诱导成骨信号转导机制变化的实验研究 [D]. 沈阳:辽宁中医学院,2005.
- [47] 张锦芳,谢伟东,张雅鸥,等. 淫羊藿黄酮诱导的骨髓间充质干细胞成骨分化中 WNT 信号通路的研究[J]. 现代生物医学进展,2010,10(06):1006-1008.
- [48] 陈志光. 补肾调肝方调控 WNT 信号通路诱导衰老 MSC 成骨分化的蛋白质组学研究[J]. 中国医药指南,2012,20(10):294-295.

(编辑:徐建平)

(英文摘要见第 98 页)

Theory and Clinical Application of Shenque Point Moxibustion on Salt Therapy

ZHA Bi-xiang¹, YANG Jun², SHI Fei-fei³

(1. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038;

2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031;

3. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230061)

ABSTRACT: This research is to make it more convenient for the medical workers and researchers to know the therapy of Shenque point moxibustion on salt, and make a better combine between theory study and clinical practice. By investigating the related documents of Shenque point moxibustion on salt therapy and summarizing three aspects of this therapy, including the basic theory, applied in ancient times and modern clinical application. All the researches have indicated that the therapy has curative effect on the treatment of some diseases. Moreover, without any side effects, so it is worthwhile to be further explored and widely applied to clinical practice.

KEY WORDS: Shenque point; moxibustion on salt; summarize

(原文见第 91 页)

Progressive Studies on Effects and Mechanisms of Traditional Chinese Medicines on Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells

ZHANG Xin^{1,2}, LI Ma-lin^{2,1}

(1. School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2. School of Pharmacy, Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500)

ABSTRACT: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) have an active ability of multidifferentiation. Because of some advanced characteristics including sampling convenience, no immune rejection, it becomes a research hot spot, and now widely used in Chinese medicine researches, especially in studies of osteogenic differentiation induced by Chinese medicine. Evidences show that the traditional Chinese medicines can induce BMSCs differentiate into osteoblast, and increase expression of specific markers of osteogenesis such as alkaline phosphatase and osteocalcin. The mechanisms are also studied by researchers, reported different signal pathways are activated. In this paper, the studies of traditional Chinese medicines on osteogenic differentiation of BMSCs are summarized.

KEY WORDS: traditional Chinese medicine; bone mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; effect; mechanism; research process